Agilent 6410 Triple Quadrupole を使用したテラピア中のニトロフラン代謝物の分析

アプリケーション

食品安全性

著者

Feng Liang, Peibin Hu, and Ping Li
Agilent Technologies, Inc.
Beijing, China

要約

食肉や食肉加工品で禁止されているニトロフラン系合成抗菌剤の代謝物は、新型 Agilent 6410 三連四重極型質量分析計を用いた LC/MS/MS を使用して分析します。この分析法は、4 種類の測定対象化合物それぞれに対して 0.01 ppb (10 ppt) までの非常に高感度測定が可能であることを示しました。0.1 ～ 10 ppb の測定結果は、分析法の性能として欧州連合が設定している確認のための基準をすべて満たしています。淡水養殖用試料に対する LC/MS/MS 法の性能を示すためにテラピアの抽出物を使用しました。

緒言

ニトロフランは、グラム陽性菌やグラム陰性菌に使用される安価な合成抗菌剤です。これらは、家畜や養殖魚の胃腸感染症や皮膚感染症の治療に使用されてきました。さらに、蜂の細菌を処理するためにも使用されてきました。親化合物とその代謝物の両方が発癌性物質と疑われているため、これら一連の化合物は世界中で禁止になりました。『The Rapid Alert System for Food and Feed Annual report for 2005』[1] では、これらの化合物が食品サンプル中に引き続き検出されており、食品安全性の大きな懸案事項のままであることを示しています。4 種類の化合物、フラゾリドン、フラルタドン、ニトロフラントイン、ニトロフラゾンは素早く代謝することが判っており、代謝物は筋肉組織に結合します。従って、動物由来のサンプル中に対して、親化合物ではなく代謝物の検出が必要です。

欧州 (EU) が規定した動物および動物性食品中の動物用医薬品の検出および確証基準 [2] は、世界の多くで受け入れられています。この基準は、スペクトル手法と組み合わせた分離手法を義務づけています。ニトロフランなどの禁止物質には、残留基準 (MRL) は設定できません。従って、最小限界値 (MRPL) を各代謝物に対して 1 µg/kg に設定しています [3]。LC/MS 法 だけがこれらの基準を満足でき、非常に良い分析法が報告されています [4 ～ 6]。しかし、最も幅広く受け入れられている方法では三連四重極型質量分析計を用いています。新型 Agilent 三連四重極型 LC/MS システムを使用して、これらの代謝物の分析例を示します。

実験

試薬

ニトロフラン代謝物の誘導体化標準試料とサンプル調製用のすべての試薬は、食品製造会社から入手しました。アセトニトリルはメルク (ドイツ、ダルムシュタット) 製の HPLC 用です。ギ酸はメルク (ドイツ、ダルムシュタット) 製の特級試薬です。

サンプル調製

サンプル調製の手順は以下の通りです。テラピア 2 g を 0.125 M HCL 15 mL に加え、混合物をホモジナイズしました。この溶液に、2- ニトロベンズアルデヒド 溶液 (50 mM の DMSO 溶液) 50 µL を加え、振とうしました。次に、この溶液を 37 ˚C で 16 時間、静置しました。その後、NaOH と K_2HPO_4 で pH 7 に中和しました。次に、中性の誘導体化試料を酢酸エチルで抽出した後、蒸発乾固して、そして LC の初期移動相 100 µL で再溶解しました。4 種類の代謝物の標準試料は 0.125 M の HCl に添加して、誘導体化し、テラピアのサンプルに使用した同じ手順で抽出しました。

LC/MS/MS メソッド

LC 条件

装置:	Agilent 1100 LC
カラム:	C18、2.1 mm x 150 mm、3 µm
カラム温度:	40 ˚C
移動相:	A = 0.1% ギ酸水溶液 B = アセトニトリル
グラジエント:	0 分で B を 22% 6 分で B を 99% 9 分で B を 99%
流量:	0.3 mL/min
注入量:	50 nL

MS 条件

装置:	Agilent 6410 LC/MS Triple Quadrupole
イオン化モード:	ポジティブ ESI
乾燥ガス流量:	10 L/min
ネブライザ:	35 psig
乾燥ガス温度:	350 ˚C
V_{cap}:	5000 V

定量

MRM パラメータ表に記載している最初の MRM トランジションを使用して、定量分析を行いました。確認基準として、確認用クォリファイアイオンには 2 番目の MRM トランジションを使用しました。新 MassHunter 定量分析ソフトウェアを使用して、定量を行いました。

結果と考察

誘導体化と抽出を考慮すると、アミノヒダントイン(AH)、3- アミノ-5- モルホリノメチル-2- オキサゾリジノン (AMOZ)、3- アミノ-2- オキサゾリジノン(AOZ)、セミカルバジド(SC) の各代謝物の必要検出下限 1 ppb を満足する装置感度はこの分析にとって重要な性能です。この性能を実証するため、各 2- ニトロベンズアルデヒド (2-NBA) 誘導体化代謝物の標準試料は、図 1 の 0.01 ppb (10 ppt) のとおりです。各誘導体化代謝物の構造式が示されており、それぞれ各ピークの S/N 比は 3:1 以上を示しています。性能の別の指標は直線性です。この濃度 (10 ppt) ～ 10 ppb の検量線は図 2 に示しており、全て良好な直線性を示しています。

魚へのニトロフランの使用は、食品安全性と EU 加盟国への輸入にとって継続的な問題です。Agilent 三連四重極型 LC/MS の性能を示すため、テラピアサンプルに 4 種類の代謝物を添加し、加水分解後、誘導体化、抽出を行いました。500 ppt 添加テラピア抽出物の分析結果は図 3 のとおりで、MRPL の 1/2 濃度で測定したクロマトグラムを示しています。感度要件を満足することに加えて、標準試料との保持時間の一致、そして定量イオンに対するクオリファイアイオンの相対強度を指定許容範囲内で測定するといった確認基準をも満足しなければなり

MRM モードパラメータ

化合物	推移	デュエルタイム (ms)	フラグメンタ電圧 (V)	衝突エネルギー (V)	MR2 分解能
AMOZ	335.1 → 291.4	60	100	5	ユニット
	335.1 → 262.4	60	100	5	ユニット
SC	209.1 → 192.3	60	100	5	ユニット
	209.1 → 166.3	60	100	5	ユニット
AH	249.1 → 134.2	60	100	5	ユニット
	249.1 → 104.2	60	100	5	ユニット
AOZ	236.0 → 134.1	60	100	5	ユニット
	236.0 → 104.1	60	100	5	ユニット

ません。この許容値は、標準試料を分析した際に得られる比率により設定され、比率が下がるにつれて許容値は高くなります。この許容値は 0.5 以上の相対比強度を持つイオンに対して 20% であり、0.1 以下の比率を持つイオンに対して 50% です。

表 1 には、代謝物の標準品を添加後、誘導体化、抽出したテラピア試料の結果を示しています。検量線の作成には添加テラピア抽出液を使用しました。従って、最終濃度はこの検量線から直接計算可能です。定量結果の一覧表は MassHunter ソフトウェアを使用したバッチテーブルで表示され、異常値は青 (低) と赤 (高) で示すことが可能です。この表はブランク試料中、AMOZ の保持時間の許容値内に 1 本のピークが検出されていますが、クォリファイアイオンの比率は低いことを示しています。AOZ と SC に関しては、疑わしいピークの保持時間が許容範囲外であることを示しています。AH は、0.5 ppb 添加試料で、クォリファイアイオン比率がこの許容範囲外であることを示しています。

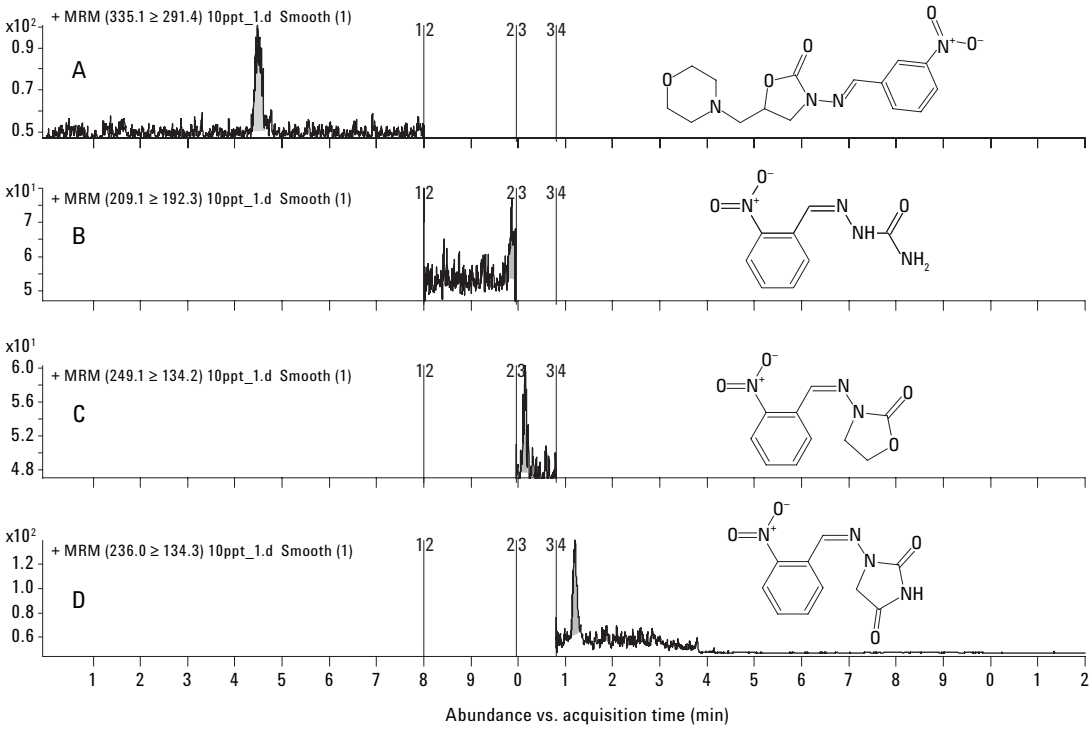

図 1　A) 2-NBA AMOZ、B) 2-NBA SC、C) 20NBA AH、D) 2-NBA AOZ の 10 ppt での各誘導体化代謝物の MRM Quant イオンクロマトグラム

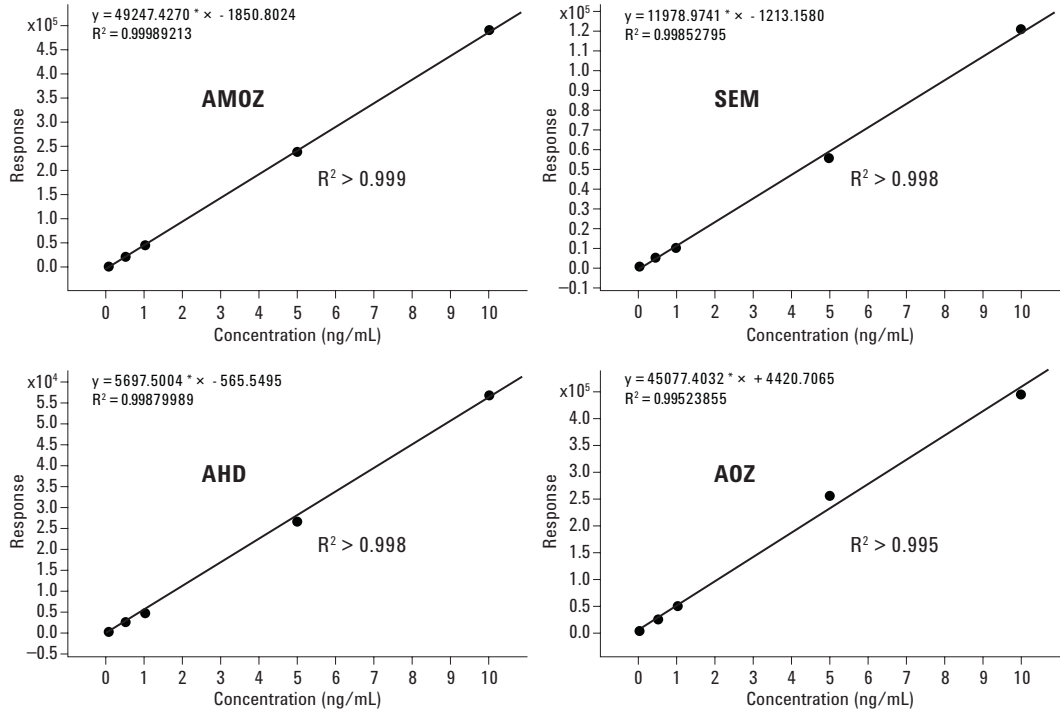

図 2　　直線範囲 10 ppt ～ 10 ppb のニトロフラン代謝物の検量線。

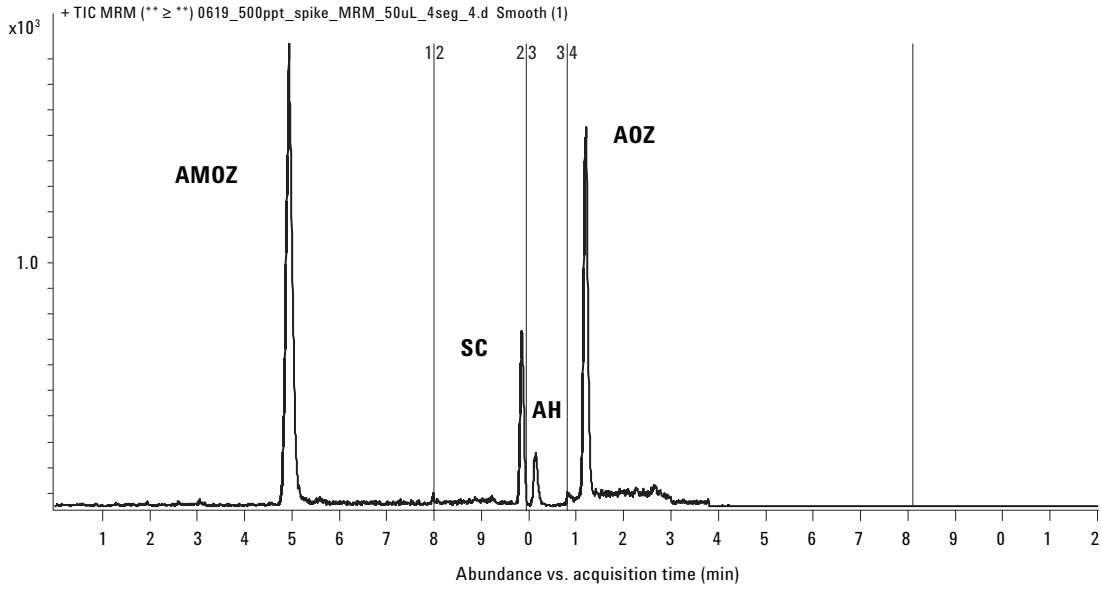

図 3　　500 ppt の各代謝物でスパイクされたテラピアサンプル抽出物。

表 1　セルフキャリブレーションされたテラピアスパイクの分析。クォリファイア比とレポートされたリテンションタイムを記載

		AH	Qualifier		AMOZ	Qualifier		AOZ	Qualifier		SC	Qualifier
Name	RT	Final Conc.	Ratio	RT	Final Conc.	Ratio	RT	Final Conc.	Ratio	RT	Final Conc.	Ratio
Nitrofuran Blank		0.00		2.72	0.02	8.70	8.71	0.00		7.94	0.00	
Nitrofuran 0.5 ppb	8.66	0.54	6.07	2.62	0.51	17.44	9.19	0.37	7.99	8.44	0.50	65.32
Nitrofuran 1 ppb	8.66	1.07	15.83	2.64	0.92	20.42	9.19	1.06	10.19	8.44	1.05	70.85
Nitrofuran 3 ppb	8.67	3.42	13.78	2.65	3.41	18.67	9.20	3.18	9.51	8.44	2.89	67.47
Nitrofuran 5 ppb	8.66	5.71	14.24	2.66	4.66	19.28	9.19	4.89	8.61	8.44	5.05	69.06

結論

この研究では魚試料中のニトロフラン代謝物の高感度分析に対し、新型 Agilent 6410 LC/MS 三連四重極型質量分析計が高性能であることを実証しました。このシステムは性能必要条件を容易に満たすことが可能であり、定量ソフトウェアは欧州委員会が指定した、すべての確認基準の計算、レポートが可能です。

参考文献

1. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2005, p29, http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm.
2. E. Commission, 2002/657/EC:Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C [2002] 3044) 2002.
3. E. Commission, 2003/181/EC:Commission Decision of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin (Text with EEA relevance) (notified under document number C[2003] 764) 2003.
4. B. Wüst, C. Sauber, and H. J. A. van Rhijn, “Quantitation of Nitrofuran Metabolites in Shrimp and Poultry by LC/MS/MS Using the Agilent LC/MSD Trap XCT,” Agilent Technologies publication, 5989-0738EN: March 25, 2004.
5. M. Takino, “Determination of the Metabolites of Antibacterial Drugs in Chicken Tissue by Liquid Chromatography Electrospray Ion ization Mass Spectrometry (LC-ESI-MS),” Agilent Technologies publication, 5988-8903EN:March 19, 2003.
6. F. Mandel, B. Wüst, and C. Sauber, “High Resolution Quantitative Analysis of Nitrofuran Derivatives in Poultry and Shrimp Using a New oa-ESI-TOF,” Agilent Technologies publication, 5989-1302EN:July 9, 2004.

詳細情報

Agilent 製品およびサービスの詳細は、Agilent のウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

Agilent は、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。
また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。
著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies,Inc. 2006

Printed in Japan
October 31, 2006
5989-5808JAJP

Agilent Technologies